

Diseño y validación de un sistema inmunoenzimático ELISA para cuantificar lipoproteína (a) en suero humano

Design and validation of an immunoenzymatic system (ELISA) that quantifies lipoprotein(a) in human serum

Dra. Aidelían Jevey González; Dr. Andrés Pedrosa Amado; Dr. Ángel Nápoles Vega; Dra. Silvia Hernández González; Dr. Roger Ramírez Zayas

Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey, Cuba.

RESUMEN

La lipoproteína (a) es considerada un factor de riesgo cardiovascular. Elevadas concentraciones en sangre de esta lipoproteína están asociadas con un incremento de la incidencia y severidad de la aterosclerosis. La evaluación del riesgo cardiovascular relacionada con la Lp(a) se realiza sobre la base de las concentraciones plasmáticas de dicha lipoproteína. Las concentraciones séricas de esta lipoproteína se miden a través de diferentes métodos, pero los ensayos inmunoenzimáticos ELISA son los de mayor aplicación en esta finalidad. En nuestra investigación se describe el diseño y la validación de un sistema ELISA, indirecto, tipo sándwich, que utiliza anticuerpos poligonales anti-Lp(a) humana. La validación del sistema se realizó según los parámetros propuestos por el Europeun Committee for Clinical Laboratory Standard y se aplicaron los siguientes parámetros: curva de calibración, imprecisión (within-run y between-run), sensibilidad, especificidad y determinación de Lp(a) en suero de pacientes.

DeCS: DISEÑO DE DROGAS; TEST DE ELISA; LIPOPROTEÍNAS.

ABSTRACT

Lipoprotein (a) is considered a cardiovascular risk factor. High blood concentrations of this lipoprotein are associated with an increased incidence and severity of atherosclerosis. Assessment of the cardiovascular risk associated with Lp(a) is carried out on the bases of plasmatic concentrations of the said lipoprotein. Serum concentrations of this lipoprotein has been measured by different methods, but immunoenzymatic essays ELISA have had more application in this respect. In this work, design and validation of an indirect, sandwich type ELISA system validation was performed according to the proposed parameters by the European Committee for Clinical laboratory Standard. Among these parameters, the following are applied to our system: calibration curve, unpreciseness (within run and between run) determination of Lp(a) in the serum of patients.

DeCS: DRUG DESIGN; ENSYME-LINKED INMUNOSORBENT ASSAY; LIPOPROTEINS.

INTRODUCCIÓN

El índice actual de morbilidad y mortalidad por enfermedad de la arteria coronaria, la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad vascular periférica, ha aumentado en la población mundial. Estas enfermedades están relacionadas con el desarrollo de la aterosclerosis, afección multifactorial de causa no precisada, pero de la que se conocen actualmente algunos factores de riesgo, cuyo control puede detener la progresión de la misma. ¹

La Lp(a), una partícula similar a la lipoproteína de baja densidad (LDL), es considerada como un factor mayor e independiente de riesgo cardiovascular ² y de aterosclerosis preclínica ³ Elevadas concentraciones en sangre de esta lipoproteína están asociadas con un incremento de la incidencia y severidad de la aterosclerosis. ^{4,5}

La evaluación del riesgo cardiovascular asociado con la Lp(a) se realiza sobre la base de las concentraciones plasmáticas de dicha lipoproteína. ⁶

Se han medido las concentraciones de Lp(a) en suero o plasma mediante inmunodifusión radial, electroinmunoensayo, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo y ensayo inmunoenzimático. ^{7,8} Dentro de estos, los ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida, ELISA HGhg, tienen una gran aplicación debido a su alta sensibilidad y especificidad. ^{9,10}

En esta investigación se describe el diseño de un sistema ELISA indirecto tipo sandwich que utiliza anticuerpos policlonales anti-Lp(a) humana.

MÉTODO

En este sistema, la retención de enzimas presentes en el conjugado, es proporcional a la cantidad de elementos a determinar, inmovilizados por el anticuerpo captura; que constituye la base teórica del sistema ELISA diseñado. ¹¹

La validación del sistema se realiza según los parámetros propuestos por el European Committee for Clinical Laboratory Standard. ¹² Los aplicados en este fueron:

- . Curva de calibración, confeccionada con las concentraciones conocidas de los controles positivos.
- . Imprecisión, la cual implica el comportamiento de la precisión del sistema intraplaca (within-run) e interplaca (between-run).
- . Sensibilidad, se define como la concentración de Lp(a) que se corresponde con la absorbancia de los blancos, más dos desviaciones estándar.
- . Especificidad, se ensayan las posibles reacciones cruzadas contra metabolitos séricos.
- . Determinación de Lp(a) en suero de pacientes.

1. Diseño del sistema ELISA

Se diseña un ELISA-HADAS no competitivo, de tipo sándwich, que utiliza doble anticuerpo heterólogo. Consta de ocho fases:

- . Fase I de sensibilización, fase sólida en placa de microtitulación de cloruro de polivinilo y el anticuerpo de captura una IgG policlonal de carnero anti-Lp(a) humana.
- . Fase II de bloqueo con PBS1X/Tween 200, 05 % / 200mg leche descremada.

- Fase III de muestras y controles con suero humano; C Reference Standart Human Lp(a) y C+ BSA (BDH. England).
 - Fase IV del segundo anticuerpo con IgG policlonal de conejo anti-Lp(a) humana. (Laboratorio de Inmunología y Biológicos)
 - La fase V de conjugado con IgG de carnero anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa 1:3000;
 - Fase VI del sustrato con OPD;
 - Fase VII de detener la reacción con ácido sulfúrico 2N.
 - Fase VIII de lectura de la placa en Labsystem Multiskan Plus a 492nm.
- Al final de cada fase, hasta la V se realiza un lavado con PBS 1X/Tween 20 0,05 %

I. ESTANDARIZACIÓN DEL SISTEMA

1. Sensibilización: se ensayan concentraciones de anticuerpos captura (recubrimiento) entre 1 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se incuba en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$						6.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$			
C												
D												
E			4,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$						2,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$			
F												
G												
H												

2. Bloqueo: leche descremada al 0,05 % en Buffer Bicarbonato pH: 9,6. Una hora a 37°C.

3. Antígeno: se aplican cuatro muestras duplicadas a concentraciones conocidas del antígeno utilizado. (Reference Standart Human Lp(a) 67 mg/dl. Lot. No. BG 38003. 7032900ZC08. Immuno AG. Vienna.

C⁺ - 4,18 mg/L

C⁺ - 8,37 mg/L

C⁺ - 16,17 mg/L

C⁺ - 33,5 mg/L

C⁻ - Albúmina sérica bovina (BSA) (BDH. England) a una concentración de 33, 5 mg/L.

Blanco: control del conjugado, no se pone ni antígeno ni segundo anticuerpo, en su lugar se ponen 100 µL de diluyente.

Control segundo anticuerpo: no se pone el Ag, en su lugar se ponen 100 µL de diluyente.

1. Segundo anticuerpo: IgG de conejo anti-Lp(a) humana. En diluciones de 1:1000, 1:2000, 1:3000 para cada recubrimiento.

2. Conjugado: IgG de carnero Anti-IgG de conejo conjugada con Peroxidasa. Dilución de trabajo 1:3000 (CIGB-Camagüey).

3. Solución de lavado y diluyente: PBS 1X / Tween-20 0,05%.

II. VALIDACIÓN DEL SISTEMA

Se tienen en cuenta los parámetros propuestos por el European Committee for Clinical Laboratory Standard.¹¹

Los parámetros a observar en este sistema son:

1. Curva de calibración. Para su confección se utilizan las concentraciones de los controles positivos.

2. Imprecisión. Se utilizan tres muestras con concentraciones dentro del rango analítico.

Precisión intraplaca. (Within-run): se ensayan doce veces, por duplicado, cada una de las muestras en una misma placa de microtitulación. Se calcula la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV).

Precisión interplaca. (Between-run): el ensayo se realiza con dos muestras, por duplicado, en nueve placas diferentes. Se calcula la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. (CV).¹²

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Within-run (CV)	Between-run (CV)	score	Evaluación
> 10 %	> 20 %	0	Inadecuado
5 - 10 %	10 - 20 %	1	Aceptable
< 5 %	< 10 %	2	Muy aceptable

3. Sensibilidad: para determinar el límite de detección, se ensaya el reactivo blanco (diluyente) en número de cuarenta veces por duplicado, en una placa. Se calcula la

media y la desviación estándar. El valor de detección límite es la media, más dos veces la desviación estándar ($M + 2 \times SD$).

4. Especificidad: se descartan las posibles reacciones cruzadas, utilizando metabolitos presentes en suero humano. Los ensayos se realizan contra albúmina sérica, hemoglobina, y el pigmento bilirrubina. Estos metabolitos sustituyen al antígeno en el ensayo. Los sueros utilizados se aplican a la placa en diluciones de 1:25, 1:50, 1:100.

5. Determinación en suero de pacientes: se utiliza suero de pacientes convalecientes de infarto agudo del Miocardio. Se utilizan diluciones para cada muestra de 1:25, 1:50 y 1:100. Las muestras se conservan a -70°C hasta el momento de su utilización.

6. Aspectos subjetivos. Se tiene en cuenta:

- . Precisión del operador.
- . Claridad de los protocolos de trabajo.
- . Calidad de los reactivos y materiales utilizados.
- . Equipos calibrados y declarados aptos para el uso (CEN)

III. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Los datos se procesaron mediante el equipo Labsystems Multiskan Plus, que incluye tarjetas para el procesamiento estadístico. Otros análisis estadísticos se realizaron mediante el Microsoft Excel.

Se diseñó un sistema ELISA tipo sándwich no competitivo.

La fase sólida utilizada fue la placa de microtitulación de cloruro de polivinilo.

La concentración óptima de IgG de carnero en el recubrimiento fue de $2,8 \mu\text{g} / \mu\text{L}$

Las condiciones de incubación para esta fase en cámara húmeda, a 4°C durante toda la noche.

Para el bloqueo resultó adecuada la utilización de leche descremada al 0,05 %

El antígeno utilizado como control positivo se diluyó en orden descendente con PBS 1X.

Se incubó 1h a temperatura ambiente y con agitación mecánica.

El segundo anticuerpo (IgG de conejo anti-Lp(a) humana) se utilizó a una dilución de 1:2000 por ser la dilución en la que mostró menor reacción inespecífica. Las condiciones de incubación son las mismas que la fase anterior.

El conjugado se utilizó a la dilución de trabajo que recomienda el productor. (1:3000) y las condiciones de trabajo son iguales a la fase anterior. Luego de 30 min de incubar el sustrato (OPD) a temperatura ambiente y protegido de la luz, se detiene la reacción con ácido sulfúrico 2N.

Se hace la lectura a 492 nm en el Labsystems Multiskan Plus.

Los lavados se realizaron entre cada fase con PBS 1X/Tween-20 0,05 % como agente tensoactivo.

Evaluación de sistema

Se construyó curva de calibración.

Los valores de la evaluación de la precisión intraplaca se localizaron entre el 5 y el 10 %.

Los valores de la evaluación de la precisión interplaca se localizaron entre el 10 y el 20 %.

El límite de detección del sistema fue fijado en 2, 79 mg/l.

Se determinó que el sistema era específico.

Se realizaron determinaciones en suero de pacientes.

La curva de calibración se construyó utilizando los controles positivos.

Los resultados de la evaluación de la precisión intraplaca (within-run)

RESULTADOS

Los valores del CV se localizaron entre el 5 % y 10 %. Según el European Committee for Clinical Laboratory Standard (ECCLS) estos valores están dentro del rango aceptable (Tabla 2).

Tabla 2. Precisión intraplaca (within-run)

Muestra	Media ± DS. Lp(a) mg/ l	CV (%)
1	5,79 ± 1,30	6,37
2	19,36 ± 0,61	3,15
3	26,07 ± 2,13	8,19

Con respecto a la evaluación de la precisión interplaca (between-run), el coeficiente de variación (CV) en las nueve placas analizadas para las dos muestras osciló entre 10 % y 20 %, estos valores están dentro del rango aceptable (Tabla 3).

Tabla 3. Precisión interplaca (between-run)

Muestra	Media ± DS. Lp(a) mg/l	CV (%)
1	9,06 ± 1,30	14,34
2	34,06 ± 5,6	16,29

La sensibilidad del sistema se determinó por ensayo repetitivo (n=40) del reactivo blanco. El límite de detección del sistema fue fijado en 2,79 mg/l (media ± 2 X SD)

La especificidad del sistema se determinó descartando reacciones cruzadas con metabolitos séricos, las lecturas estuvieron por debajo del valor límite del sistema (Tabla 4).

Tabla 4. Reacciones cruzadas

Hb	1,07 mg/L
Albúmina	1,04 mg/L
Bilirrubina	0,92 mg/L

Las muestras de los resultados de la lectura realizada a sueros de pacientes se ensayaron diluidas 1:25, 1:50 y 1:100 (Tabla 5).

Tabla 5. Muestras de pacientes

Paciente	Concentración Lp(A) en suero
1	871,55 mg/L
2	413,85 mg/L

DISCUSIÓN

El sistema ELISA tipo sándwich, no competitivo, utiliza fijado a la fase sólida como anticuerpo captura un anticuerpo policlonal de carnero anti-Lp(a) humana. El segundo anticuerpo es una IgG de conejo anti-Lp(a) humana, obtenida y purificada en el Centro de Inmunología y Biológicos del ISCM-Camagüey. El diseño incluye una IgG de carnero anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa.

ESTANDARIZACIÓN DEL SISTEMA

La fase sólida utilizada (placa de microtitulación de cloruro de polivinilo) en ocasiones muestra una fuerte coloración de fondo, pero son recomendadas cuando se utiliza en esta fase de sensibilización inmunoglobulinas, al ser el fenómeno de desabsorción menos frecuente.¹⁰

La concentración óptima de IgG de carnero en el recubrimiento fue de 2, 8 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. Esta selección se hace en base a los resultados que permiten una mayor diferenciación entre los controles positivos más débiles y los controles negativos.^{10, 11} Las condiciones de incubación para esta fase en cámara húmeda, se realiza durante toda la noche a 4°C.^{11,12}

CONCLUSIONES

1. Se diseñó un sistema ELISA indirecto que utiliza doble anticuerpo heterólogo que cuantifica Lp(a) en suero humano.
2. El sistema propuesto cumple con los parámetros de evaluación que exige el ECCLS como son imprecisión (precisión interplaca y precisión intraplacas), sensibilidad y especificidad.
3. El sistema diseñado es de utilidad en la cuantificación sérica de Lp(a) en suero de pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cantin B. Association of fibrinogen and lipoprotein (A) as a coronary heart disease risk factor in men (The Quebec Cardiovascular Study). *Am J Cardiol.* 2002;89(6):662-6.
2. Chimienti G, Lamanuzzi BL, Nardulli M. APO(A) variants and lipoprotein (A) in men with or without myocardial infarction. *Exp Mol Pathol.* 2002;73(1):28-34.

3. Dionyssiou-Asteriou A, Papastamatiou M, Vatalas IA, Bastounis E. Serum apolipoprotein AI levels in atherosclerotic and diabetic patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24(2):161-5.
4. Sasaki H, Konisi K. Pathophysiology and diagnosis for arteriosclerosis obliterans. *Rinsho Byori.* 2002;50(8):802-6.
5. Glader CA, Birgander LS, Stenlund H, Dahlen GH. Is lipoprotein (A) a predictor for survival in patients with established coronary artery disease? Results from a prospective patient cohort study in northern Sweden. *J Intern Med.* 2002;252(1):27-35
6. Luc O. Lipoprotein (A) as a predictor of coronary heart disease: the prime study. *Atherosclerosis.* 2002;163(2):377-84.
7. Misirli H, Somay G, Ozbal N, Yasar Erenoglu N. Relation of lipid and lipoprotein (A) to ischaemic stroke. *J Clin Neurosci.* 2002;9(2):127-32.
8. Lundstam U, Herlitz J, Karlsson T, Linden T, Wiklund. Serum lipids, lipoprotein (A) level, and apolipoprotein (A) isoforms as prognostic markers in patients with coronary heart disease. *J Intern Med.* 2002;251(2):111-8.
9. Marz W, Grob W. Quantification of human serum lipoprotein (A). *Clin Chem.* 1989;9:15-26.
10. Bracho D. Manual de inmunodiagnóstico. Fundamento y aplicaciones. La Habana: EDILVZ; 1997.
11. Labeur C, Rosseneu M, Herdenson O. International Lp(A) Standardization. *Chem Phys Lip.* 1994;67:265-70.
12. Peralta E, Frías M. Manual sobre técnicas inmunoenzimáticas ELISA. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1987.

Recibido: 16 de junio de 2003.

Aceptado: 18 de enero de 2004.

Dra. Aidelian Jevey González. Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Instructor. Facultad de Ciencias Médicas. Las Tunas. Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey, Cuba.